Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. H. A. Hirsch

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON 5α-PREGNAN-3, 20-DION UND PROGESTERON IM FRUCHTWASSER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

ANDREAS REINECKE
aus
Siegen

1984

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. H. A. Hirsch

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON 5α-PREGNAN-3, 20-DION UND PROGESTERON IM FRUCHTWASSER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

ANDREAS REINECKE
aus
Siegen

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. A.E. Schindler
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Heller

Meiner Mutter
und
meinem Vater

Herrn Prof. Dr. med. A.E. Schindler
danke ich für die Überlassung des Themas
und die Betreuung während der Durchführung
der Untersuchungen.

Den Mitarbeitern des endokrinologischen Labors
der Universitätsfrauenklinik Tübingen, besonders
Frau Christa Veit und Herrn M. Zwirner, danke
ich für die freundliche Unterstützung bei der
Laborarbeit.

Bei meinen Kommilitonen Eva Klemm-Wolfgramm,
Florian Bopp und Egbert Tannich bedanke ich
mich für die gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

5α-DHP	= 5α-Dihydroprogesteron = 5α-Pregnan-3,2o-dion
RIA	= Radioimmunoassay
SSW	= Schwangerschaftswoche
RR	= nach der Methode von Riva Rocci bestimmter Blutdruck
GP	= Gelatinepuffer
T	= Tracer = radioaktiv markiertes Hormon
cmp	= counts per minute = Zählausbeute pro Minute
SD	= Standard Deviation = Standardabweichung
SEM	= Standard Error of the Mean = Standardfehler des Mittelwerts
n	= Anzahl der Proben

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. METHODEN	
2.1. Auswahl der Proben	
2.1.1. Normalkollektiv	5
2.1.2. Pathologische Kollektive	
2.1.2.1. EPH-Gestose	5
2.1.2.2. Rh-Inkompatibilität	6
2.1.2.3. Diabetes mellitus	6
2.1.2.4. Frühgeburtlichkeit	6
2.1.2.5. Azidosekollektiv	6
2.2. Gewinnung der Fruchtwasserproben	
2.2.1. Fruchtwasserentnahme durch Amniozentese	7
2.2.2. Fruchtwasserentnahme während der Eröffnungsperiode	8
2.3. Bestimmung des 5α-Pregnan-3,2o-dion	
2.3.1. Extraktionsvolumen	8
2.3.2. Bestimmung der individuellen Wiederfindung	9
2.3.3. Hormonextraktion	9
2.3.4. Säulentrennung	1o
2.3.5. Aufnahme des extrahierten 5α-Pregnan-3,2o-dion	11
2.3.6. Kontrollen	11
2.3.7. Radioimmunoassay	
2.3.7.1. Standardkonzentration	12
2.3.7.2. Verdünnung des markierten Hormons	12
2.3.7.3. Antiserumherstellung	12
2.3.7.4. Bestimmung der Kreuzreaktion des Antikörpers	13
2.3.7.5. Antiserumverdünnung	14
2.3.7.6. Durchführung des Radioimmunoassays	14
2.4. Bestimmung des Progesteron	18
2.5. Auswertung	
2.5.1. Bestimmung und Umrechnung der Zählausbeuten	18
2.5.2. Übertragung der Patientendaten auf Computerkarten	18
2.5.3. Statistische Auswertung	19

Seite

3. MATERIAL

3.1. Geräte 21

3.2. Chemikalien 21

3.3. Lösungen 22

4. ERGEBNISSE

4.1. Kreuzreaktionen des Antikörpers 11o/5 24

4.2. Säulentrennung von 5α-Pregnan-3,2o-dion und Progesteron 24

4.3. Qualitätskontrolle der 5α-DHP-Bestimmung 27

4.4. Bestimmung des Antikörpertiters für das Antiserum 11o/5 28

4.5. Abhängigkeit der Nullbindung von der Inkubationsdauer des Radioimmunoassays 29

4.6. Klinische Daten des Gesamtkollektivs und des Normalkollektivs 31

4.7. Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler der Mittelwerte und Anzahl der Proben für 5α-DHP und Progesteron

4.7.1. Gesamtkollektiv 3o

4.7.2. Normalkollektiv 31

4.7.3. Pathologische Kollektive

4.7.3.1. EPH-Gestose 31

4.7.3.2. Rh-Inkompatibilität 32

4.7.3.3. Diabetes mellitus 32

4.7.3.4. Frühgeburtlichkeit 33

4.7.3.5. Azidosekollektiv 33

4.8. Untersuchung des Einflusses mütterlicher Parameter auf die Hormonkonzentration

4.8.1. Parität der Mutter 34

4.9. Untersuchung des Einflusses kindlicher Parameter auf die Hormonkonzentration

4.9.1. Geschlecht des Kindes 34

4.1o. Korrelation zwischen 5α-DHP und Progesteron 35

5. DISKUSSION 49

6. ZUSAMMENFASSUNG 56

7. LITERATURVERZEICHNIS 58

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren ist es durch die Entwicklung neuer technischer Methoden gelungen, einen besseren Einblick in das Leben des Feten in utero zu bekommen. Mittels verschiedener Verfahren wie der Ultraschallbiometrie, der Kardiotokographie und biochemisch-endokrinologischer Methoden sind Aussagen über das Befinden des Feten möglich geworden, die diagnostische und therapeutische Entscheidungen erlauben.

Es hat sich gezeigt, daß endokrinologische Bestimmungen besonders zuverlässige Parameter für den Verlauf einer Schwangerschaft darstellen, Auskunft über die Plazentafunktion und eine intakte oder gestörte feto-plazentare Einheit geben. Seit der Entwicklung radioimmunologischer Meßmethoden können Substanzen in extrem niedrigen Konzentrationen, etwa im ng/ml-Bereich bestimmt werden.

Viele der heute üblichen Verlaufsbestimmungen von Steroiden während der Schwangerschaft werden aus dem mütterlichen Plasma vorgenommen. Ein direkterer Aufschluß über den fetalen Zustand wäre über Messungen aus dem Medium möglich, das den Feten unmittelbar umgibt: dem Fruchtwasser. Allerdings verbietet sich eine Anwendung der Amniozentese zur Fruchtwassergewinnung ohne strenge Indikationstellung wegen der möglichen Risiken dieser invasiven Diagnostik für die Schwangerschaft.

Nach SCHINDLER et al. (1974) ist zu vermuten, daß der Steroidgehalt des Fruchtwassers maßgeblich durch den fetalen Urin bestimmt wird, da beide Flüssigkeiten identische Steroidmuster besitzen.
Der Steroidgehalt des Fruchtwassers wird demnach vom fetalen Steroidmetabolismus und von der exkretorischen

Leistung der fetalen Nieren bestimmt, die beispielsweise bevorzugt 16-hydroxylierte Steroide ausscheiden. Die so ins Fruchtwasser gelangten Steroide können

1. von der fetalen Haut absorbiert werden
2. oral in den fetalen Darm gelangen
3. über Amnion und Chorion in den mütterlichen Kreislauf aufgenommen werden.

Trotz dieser neuen Entwicklungen ist es bisher nicht gelungen, die Ätiologie schwerer Schwangerschaftserkrankungen, etwa der EPH-Gestose, im Interesse einer kausalen Therapie aufzuklären. Eine deutliche Ausprägung der Kardinalsymptome dieser Erkrankung, Ödembildung, Proteinurie und Hypertonie findet sich bei drei bis zehn Prozent, eine Eklampsie in o,o5 bis o,1 Prozent der hospitalisierten Schwangeren und Gebärenden (GOECKE 197o). Bei 25 % der perinatal verstorbenen Mütter und bei 2o bis 4o % der perinatal verstorbenen Kinder soll eine Spätgestose mit der Todesursache in engem Zusammenhang stehen (GOECKE 197o).

Neben einer Vielzahl von Erklärungsversuchen wird der Hypothese der plazentaren Minderdurchblutung zur Zeit die größte Beachtung geschenkt. Aufgrund der Minderdurchblutung sollen in der Plazenta vasopressorische Mechanismen in Gang gesetzt werden, gleichzeitig wird eine veränderte Reaktionsfähigkeit des Gefäßsystems angenommen. KAPLAN und SILAH (1964), CHESLEY und TEPPER (1967) und GANT etal. (1973) konnten zeigen, daß die während der Gravidität bestehende vaskuläre Refraktärität gegenüber Angiotensin II bei Schwangeren, die eine EPH-Gestose entwickeln, signifikant reduziert ist.

In diesem Zusammenhang stand der Stoffwechsel des Progesteron in den letzten Jahren im Mittelpunkt des Interesses. Progesteron wird während der Schwanger-

schaft aus Cholesterin über Pregnenolon in der Plazenta gebildet. Ein bis zur Geburt ansteigender Spiegel im mütterlichen Blut wird für die Schwangerschaftserhaltung als notwendig angesehen. Von der Plazenta aus gelangt Progesteron in den mütterlichen Kreislauf und in den Feten, wo es rasch in verschiedene Metaboliten umgewandelt wird.

SAMMOUR et al. berichteten 1975, daß sich das klinische Bild bei 8o % der Gestose-Patientinnen besserte, nachdem 2oo mg Progesteron pro Tag i.m. verabreicht wurden.

1978 machten EVERETT et al. auf den Metaboliten 5α-Pregnan-3,2o-dion aufmerksam, indem sie die Überzeugung vertraten, nicht das Progesteron selbst, sondern dieser Metabolit sei über das Prostaglandinsystem für eine indirekte Hemmung des Angiotensin II und damit für die therapeutischen Erfolge verantwortlich.

Demnach hätte ein Mangel an 5α-Pregnan-3,2o-dion eine Schlüsselstellung in der Pathogenese der EPH-Gestose. Doch nicht nur für die Ätiologie der EPH-Gestose wird dem 5α-Pregnan-3,2o-dion eine entscheidende Rolle beigemessen. MILEWICH et al., die 1975, im gleichen Jahr wie STOA et al., das 5α-Pregnan-3,2o-dion im peripheren Blut schwangerer Frauen nachgewiesen hatten, vermuteten einen kausalen Zusammenhang des Progesteronmetabolismus mit dem Beginn der Geburt (MILEWICH et al., 1977). Sie konnten zeigen, daß Amnion- und Chorionzellen 5α-Reduktase-Aktivität besitzen, um aus Progesteron 5α-Pregnan-3,2o-dion zu bilden. Genauere Untersuchungen (MILEWICH et al. 1977 und MILEWICH et al. 1979) der Kinetik des Progesteronmetabolismus in den fetalen Eihäuten ergaben, daß die spezifische Aktivität der 5α-Reduktase in der 14. bis 2o. Schwangerschaftswoche zwei bis sechsfach höher ist als in der

33. Schwangerschaftswoche. Gleichzeitig sinkt der Spiegel an freiem Progesteron dort durch das Auftreten eines progesteronbindenden Hormons, dessen Bindungskapazität nach der 38. Woche signifikant ansteigt.

Auf diese Weise könnte es durch lokalen Entzug von Progesteron bzw. seiner Metaboliten wiederum über eine Induktion des Prostaglandinsystems zum Beginn der myometrialen Kontraktionen und damit der Wehen kommen.

Die geschilderten Fragestellungen, der Zusammenhang von 5α-Pregnan-3,2o-dion und EPH-Gestose, sowie die Rolle des Progesteronmetabolismus bei dem Beginn der Geburt, machen deutlich, daß eine Untersuchung des 5α-Pregnan-3,2o-dion auch im Fruchtwasser sinnvoll ist.

Die hier vorliegende Arbeit versucht, im Rahmen einer Studie über die Bestimmung von 5α-Pregnan-3,2o-dion im mütterlichen Plasma und im Nabelschnurblut, zum ersten Mal 5α-Pregnan-3,2o-dion und seine Korrelation zum Progesteron im Fruchtwasser zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde die von MILEWICH et al. (1975) angegebene radioimmunologische Bestimmungsmethode überarbeitet und die Konzentration von 5α-Pregnan-3,2o-dion und Progesteron in 241 Fruchtwasserproben von schwangeren und gebärenden Frauen bestimmt.

2. Methoden

2.1. Auswahl der Proben

2.1.1 Normalkollektiv

Die Zusammenstellung des Normalkollektivs erfolgte nach modifizierten Kriterien, die von RODECK et al. 1976 aufgestellt worden waren.

Die Anamnese der aufgenommenen Schwangeren bot keinen Anhalt für allgemeine Erkrankungen, Mehrlingsschwangerschaften wurden ausgeschlossen.

Bei sämtlichen Kontrollen während der Schwangerschaft waren Blutdruck, Gewichtszunahme und der Urinbefund der Schwangeren sowie die sonographisch festgestellte Größe des Feten im Normbereich.

Die Geburt erfolgte in der 38. bis 42. Schwangerschaftswoche, es wurden nur Lebendgeborene berücksichtigt, die mindestens 2500 g wogen.

2.1.2. Pathologische Kollektive

2.1.2.1. EPH-Gestose

Diese Gruppe enthält Schwangerschaften, bei denen pathologische Phänomene einer EPH-Gestose zu einem Gestose-Index von mehr als drei führten.

Der Index wurde nach Kriterien erstellt, wie sie GOECKE (1970) angibt. Mit zunehmender Schwere der Gestose ergibt sich eine Skala von Null bis dreizehn Punkten.

Tab. 1: Gestose-Index nach GOECKE (1970)

	0	1	2	3
Ödeme nach Bettruhe	keine	tibiale	generalisierte	
Proteinurie in g ‰ (n.ESBACH)	<o,5	o,5-2,o	>2 - 5	> 5
Blutdruck - systolisch - diastolisch	< 14o < 9o	14o-16o 9o-1oo	>16o-18o >1oo-11o	> 18o > 11o

2.1.2.2. Rh-Inkompatibilität

Hierzu zählen die Fälle, in denen während der Schwangerschaft eine Rh-Inkompatibilität nachgewiesen wurde.

2.1.2.3. Diabetes mellitus

Schwangerschaften, bei denen ein Diabetes mellitus der Mutter bekannt war, wurden in diese Gruppe aufgenommen.

2.1.2.4. Frühgeburtlichkeit

Hierzu zählen die Schwangerschaften, die vor dem Beginn der 38. Schwangerschaftswoche mit der Geburt endeten.

2.1.2.5. Azidosekollektiv

In dieser Gruppe sind die Fälle versammelt, in denen der pH-Wert des Nabelarterienblutes des Neugeborenen unter 7,25 liegt, während alle anderen Parameter denen des Normalkollektivs entsprechen.

2.2. Gewinnung der Fruchtwasserproben

2.2.1. Fruchtwasserentnahme durch Amniozentese

Eine Amniozentese kann wegen der bekannten Risiken, wie der Möglichkeit der Induktion einer Frühgeburt, nicht ohne medizinische Indikation vorgenommen werden.

Die Indikation ist gegeben

1. bei Müttern, die älter als 35 Jahre sind.
   Durch diese Indikation war es möglich, Fruchtwasserproben aus der 16. bis 18. Woche der Schwangerschaft zu erhalten, die dem Normalkollektiv zugeordnet werden konnten;

2. bei Risikoschwangerschaften, wie EPH-Gestose, Rh-Inkompatibilität, Diabetes mellitus und Frühgeburtsbestrebungen.
   Diese Fruchtwasserproben dienten zur Erstellung der pathologischen Kollektive.

Die Fruchtwasserentnahme erfolgte nach Ermittlung von Plazentalokalisation und Kindslage unter ultraschallsonographischer Kontrolle. Nach der Hautdesinfektion mit Merfen und der Lokalanästhesie mit 1%-iger Skandikainlösung wurde die Fruchtblasenpunktion im plazentafreien Bereich durch die Bauchdecke mit einer sterilen 2-er Kanüle (9) und sterilen Einmalspritzen und darauf die Fruchtwasserentnahme durchgeführt. Es folgte das Abfüllen in Polystyrolröhrchen (1o) und anschließende Lagerung bei -20^{o} C.

Blut oder Mekonium enthaltende Proben wurden nicht verwendet.

2.2.2. Fruchtwasserentnahme während der Eröffnungsperiode

Für ein Normalkollektiv am Termin (38. bis 42. Schwangerschaftswoche) wurde Fruchtwasser in der frühen Eröffnungsperiode von Spontanpartus bei normaler Schwangerschaft entnommen.

Dieselbe Methode wurde bei Frühgeburten angewandt, die Fruchtwasserproben wurden den pathologischen Kollektiven zugeordnet.

Die Fruchtwasserentnahme erfolgte nach Desinfektion des äußeren Genitale mit Zephirollösung.
Nach Einstellen der Fruchtblase mit sterilem Amnioskop wurde die Fruchtblase punktiert, Fruchtwasser entnommen, in Polystryrolröhrchen (1o) gefüllt, eingefroren und bei -2o° C gelagert.

Blut und Mekonium enthaltende Proben wurden nicht verwendet.

2.3. Bestimmung des 5α-Pregnan-3,2o-dion

2.3.1. Extraktionsvolumen

Da die Standardkurve des Radioimmunoassays (RIA) nur in einem begrenzten Bereich linear verläuft, konnten nicht für alle Proben die gleichen Extraktionsvolumina gewählt werden.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Konzentration des 5α-Pregnan-3,2o-dion im Fruchtwasser zwischen 5 und 15 ng/ml schwankt. Daher wurde das Extraktionsvolumen für die Hormonbestimmungen mit 500µl angesetzt.

Die sich daraus ergebenden Verdünnungen der Hormonlösung führten zu Zählausbeuten, die im linearen Bereich der RIA-Eichkurve lagen.

2.3.2. Bestimmung der individuellen Wiederfindung

Um die während der Extraktion verloren gegangene Hormonmenge zu bestimmen, wurde den Plasmaproben vor der Extraktion eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem, in Äthanol (17) gelöstem 5-α-Dihydroprogesterone (11) zugesetzt, zwei Minuten auf dem Multivortexer (1) geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Konzentration des markierten Hormons wurde mit ca. 2000cpm pro Probe so niedrig gewählt, daß sie eine Wiederfindung ermöglichte, ohne im nachfolgenden RIA das Ergebnis zu beeinflussen.

Nach der Extraktion wurde die Hälfte der Probe in Zählgläschen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (18) überführt und die Restaktivität im Szintillationszähler (2) durch Vergleich mit der Ausgangsaktivität bestimmt.

2.3.3. Hormonextraktion

Zur Extraktion der Steroide wurden die Proben mit jeweils 4 ml Diäthyläther (15) versetzt und 10 Minuten auf dem Multivortexer (1) geschüttelt. Um die beiden Phasen zu trennen, wurde zunächst 15 Minuten bei 1200 g und $4^{\circ}C$ zentrifugiert (3) und die wässrige Phase im Acetonbad bei -20° C eingefroren. Die steroidhaltige Ätherphase wurde abgekippt und im

Wasserbad bei 37° C unter Stickstoffbegasung abgedampft. Das u.U. am Glasrand verbliebene Material wurde mit 5oo µl Diäthyläther (15) heruntergespült, eine Minute auf dem Multivortexer (1) geschüttelt und nochmals abgedampft.

Um die Steroidhormone säulenchromatographisch trennen zu können, wurden die Festsubstanzen in 2oo µl Isooctan (16) aufgenommen und die Lösung 2 Minuten lang auf dem Multivortexer (1) geschüttelt.

2.3.4. Säulentrennung

Die chromatographische Trennung von Progesteron und 5α-DHP erfolgte in Säulen (4) mit einem Innendurchmesser von o,45 cm und einer Höhe von 18,4 cm, an deren Auslauf ein Polypropylen-Filter eingepaßt war.

Das Säulenmaterial (21) wurde nach der Vorschrift der Firma bio Merieux (Lyon), modifiziert nach ZWIRNER (mündliche Mitteilung) in die Säulen gefüllt. Hierzu wurden die Säulen zunächst in einer Höhe von 3,5; 5,4; 7,3 bzw. 9,2 cm, vom Filterboden an gemessen, markiert. Dann wurde das Chromatolithe locker bis zur zweiten Markierung eingefüllt und, während die Säule nach oben gehalten wurde, unter leichtem Druck mit einem Glasstab bis zur ersten Markierung zusammengepreßt.

Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, so daß sich am Ende insgesamt 1,6 g Chromatolithe in einer Höhe von 7,3 cm in der Säule befanden.

Vor Gebrauch wurden die Säulen mit 15 ml Isooctan äquilibriert.

In Vorversuchen wurden die Elutionsfraktionen, in denen 5α-DHP bzw. Progesteron enthalten waren, mit Hilfe radioaktiv markierter Hormonlösung (11, 12) festgestellt.

Zur Trennung der extrahierten Steroide wurden die 2oo µl Issoctanlösung (siehe 2.3.3.) auf die Säule aufgetragen. Um möglichst die gesamte Hormonmenge auf die Säule aufzubringen, wurden die Gläschen noch zweimal mit je 2oo µl Isooctan (16) versetzt, 2 Minuten auf dem Multivortexer (1) geschüttelt und das Isooctan wiederum auf die Säule gegeben. Daraufhin wurden 1,4 ml Isooctan direkt auf die Säule aufgetragen. Der Vorlauf betrug also insgesamt 2 ml und wurde verworfen, da er keine Aktivität enthielt.

Mit weiteren 1,5 ml Isooctan wurde das 5α-DHP eluiert und in Glasröhrchen aufgefangen.

2.3.5. Aufnahme des extrahieren 5α-Pregnan-3,2o-dion

Zur Durchführung des Radioimmunoassays mußte das 5α-DHP in ein geeignetes Puffersystem überführt werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst das Isooctan bei 37° C unter Stickstoffbegasung abgedampft. Um die Ablösung des lipophilen Steroids vom Glasrand zu verbessern, wurden 2oo µl 75 % Äthanol (17) zugesetzt und die Proben 1o Minuten auf dem Multivortexer (1) geschüttelt. Vorversuche hatten ergeben, daß die hierdurch in den RIA eingebende Endkonzentration des Äthanol keinen Einfluß hat.

Danach wurden die Proben mit o,8 ml Gelatinepuffer (22) ja nach zu erwartender Hormonmenge so verdünnt, daß die späteren Zählausbeuten im linearen Bereich der Standardkurve des RIA lagen (siehe auch 2.3.1.).

2.3.6. Kontrollen

Zur Qualitätskontrolle wurden bei jedem Ansatz Plasma-

proben mit bekannter 5α-DHP-Konzentration mitgemessen.

Dazu wurde 5-α-Pregnan-3,2o-dion in kristalliner Form (13) steroidfreiem Plasma in solchen Mengen zugesetzt, daß sich Endkonzentrationen von 1o bzw. 2o mg/ml ergaben.

Zur Herstellung des steroidfreien Plasmas wurden 5oo ml Plasmakonserve mit 5o g Aktivkohle (2o) versetzt und eine Stunde auf dem Rotator (5) vermischt. Die steroidbindende Aktivkohle wurde bei 2o ooo g eine Stunde lang zentrifugiert (6) und das Plasma abpipettiert.

2.3.7. Radioimmunoassay

2.3.7.1. Standardkonzentrationen

Zur Erstellung der Standardeichkurve wurde durch Einwiegen des kristallinen Hormons (15) in Gelatinepuffer (22) eine Stammlösung von 1ooo ng/1oo µl angesetzt. Durch eine Verdünnungsreihe wurden Endkonzentrationen vo 5oo, 2oo, 1oo, 5o bzw. 2o ng/1oo µl hergestellt.

2.3.7.2. Verdünnung des markierten Hormons

Das markierte Hormon (11) war nach Herstellervorschrift gelöst und dann in 25 ml Äthanol (17) überführt worden. Die im RIA eingesetzte Konzentration wurde so gewählt, daß 1oo µl ca. 8 ooo counts pro Minute (cpm) ergaben. Hierzu wurde die Stammlösung 1:1oo mit Gelatinepuffer (22) verdünnt.

2.3.7.3. Antiserumherstellung

Als Hapten wurde 6-α-Carboxy-methylmercaptoprogesteron verwendet.

Weiße Neu-Seeland-Hasen im Alter von drei Monaten wurden zur Produktion des Antikörpers angeregt. Hierzu wurden identische Volumina des o. g. Konjugats in o,9 % NaCl-Lösung mit Complete Freud s Adjuvant (19) versetzt, so daß die Endkonzentration des Antigens o,5 mg/ml betrug. Insgesamt 2 ml der antigenhaltigen Emulsion wurden den Hasen subkutan an fünf verschiedenen Stellen des Rückens sowie intramuskulär in eine Pfote injiziert.

Booster-Injektionen wurden in dreiwöchigen Abständen durchgeführt.

Die erste Blutabnahme erfolgte nach zwei Monaten, dann in monatlichen Abständen aus einer Ohrvene. Das heparinisierte Blut wurde bei Raumtemperatur und 1 2oo g 1o Minuten lang zentrifugiert (3).

Der Antikörpertiter wurde bestimmt, indem für die Verdünnungen 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo jeweils eine Nullbindung (d. h. die Bindung, die man erhält, wenn kein unmarkiertes Hormon um die Antikörperbindungsstellen konkurriert) mit titriertem, radioaktiv markiertem Hormon (11) erstellt wurde. So konnte die Antikörperverdünnung ermittelt werden, bei der die Bindung ca. 4o % betrug.

Für den RIA wurde der aus dem Hasen N 11o isolierte Antikörper verwendet.

2.3.7.4. Bestimmung der Kreuzreaktionen des Antikörpers

Die Kreuzreaktionen des Antikörperserums 11o/5 mit 24 Steroidhormonen wurde nach LAUZON et al. (1975) berechnet:

$$\text{Kreuzreaktion} = \frac{\text{\% Verdrängung durch 1 mg Steroid}}{\text{\% Verdrängung durch 1 mg 5-}\alpha\text{-DHP}} \times 1oo\ \%$$

2.3.7.5. Antiserumverdünnung

Das antikörperhaltige Plasma wurde mit Gelatinepuffer (22 1:1oo verdünnt und eine Stunde bei 4° C mit dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde es portionsweise eingefroren und bis zum Gebrauch bei -2o° C aufbewahrt.

Die Endverdünnung wurde mit 1:7oo so gewählt, daß die Nullbindung bei ca. 4o % lag.

2.3.7.6. Durchführung des Radioimmunoassays

Das Inkubationsvolumen von insgesamt 4oo µl bestand aus 1oo µl Probe bzw. Standard, 1oo µl Verdünnung des markierten Hormons (11) und 2oo µl Antikörperverdünnung.

Um den Löscheffekt des in den Proben befindlichen Äthanols (siehe 2.3.5.) auszugleichen, wurden dem Standard jeweils 1o µl 75 % Äthanol (17) zugesetzt.

In einem Vorversuch wurde festgestellt, wie groß die Bindung nach einer halben, einer, zwei bzw. sechs Stunden Inkubation war und im Folgenden zwei Stunden lang bei 4° C inkubiert.

Die zur Beendigung der Bindungsreaktionen verwendete Aktivkohlesuspension wurde nach der im Materialteil beschriebenen Vorschrift (2o) hergestellt und unmittelbar vor dem Abstoppvorgang 2o Minuten bei 4° C mit einem Magnetrührer vermischt.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde allen im Pipettierschema (s. S. 16) angegebenen Proben in rascher Folge je 5oo µl Kohlesuspension zugesetzt, kurz auf dem Multivortexer (1) geschüttelt und 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde 15 Minuten bei 1 7oo g und 4° C zentrifugiert (?).

Der Überstand, der die antikörpergebundenen Hormone enthielt, wurde vollständig in Zählgläschen mit je 1o ml Zählflüssigkeit (18) abgekippt, während die ungebundenen Hormone an die Kohle adsorbiert und zusammen mit dieser präzipitiert wurden.

Bei hohen Hormonkonzentrationen in der Probe wurde ein entsprechend geringerer Anteil des um die Antikörperbindungsstellen konkurrierenden, radioaktiv markierten Hormons an die Antikörpermoleküle gebunden, so daß der Überstand dieser Proben eine geringere Zählausbeute ergab.

Eine Zusammenfassung des Radioimmunoassays zeigt das Pipettierschema in Tab. 2, S. 16 .

Der Gesamtablauf der Bestimmung des 5α-Pregnan-3,2o-dion wurde in dem Schema S. 17 zusammengefaßt.

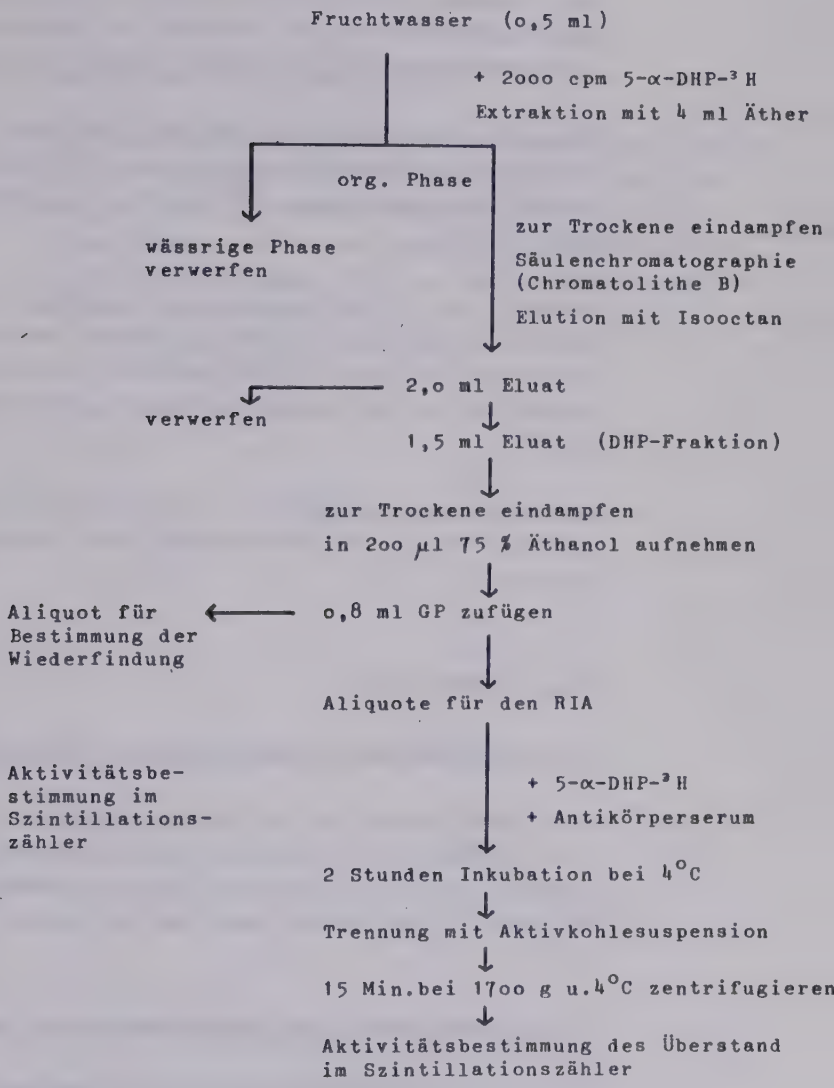
In Tabelle 2 verwendete Abkürzungen:

BG = Hintergrundstrahlung
T = Verdünnung des Markierten Hormons
NS = unspezifische Bindung durch die Aktivkohle
BO = Antikörper-Nullbindung (1oo% markiertes Hormon)

Tab. 2 Pipettierschema des Radioimmunoassays

Probenbezeichnung / Lösung (µl)	BG	T	NS	BO	Standard 2o-1ooo ng/ml	Probe
Gelatinepuffer	9oo	8oo	3oo	1oo		
Standard					1oo	
Probe						1oo
Äthanol 75 %	1o	1o	1o	1o	1o	
markiertes Hormon		1oo	1oo	1oo	1oo	1oo
Antikörperverdünnung				2oo	2oo	2oo
	2 Stunden Inkubation bei 4°C					
Aktivkohlesuspension			5oo	5oo	5oo	5oo
	schütteln und 15 Minuten bei 4°C inkubieren 15 Minuten bei 17oo g zentrifugieren - Überstand abkippen					

Zusammenfassung der 5α-Pregnan-3,2o-dion-Bestimmung



2.4. Bestimmung des Progesteron

Die Progesteronbestimmung erfolgte im RIA-Labor der Universitätsfrauenklinik Tübingen mit Hilfe des RIA-Kits Progesteron (^{125}J) der Fa. Serono, Freiburg (13).

Dieser Kit ist für die Konzentrationsmessung im venösen mütterlichen Plasma geeicht. Es war daher notwendig, den Progesteron (^{125}J)- Kit folgendermaßen zu modifizieren:

Anstelle von o,5 ml Plasma wurde das Progesteron aus jeweils o,2 ml Fruchtwasser extrahiert und nach der Extraktion erfolgte die Aufnahme mit o,3 ml Puffer anstatt der in der Kitvorschrift vorgeschriebenen o,5 ml.

Die Auswertung der Zähldaten erfolgte mit einem Gammazähler (7), die Datenausgabe über Teletype Modell 43.

2.5. Auswertung

2.5.1. Bestimmung und Umrechnung der Zählausbeuten

Die Proben wurden im Szintillationszähler (2) 2 Minuten lang gezählt. Die Auswertung erfolgte mit einem Tischcomputer (8) mit Hilfe eines Rechenprogramms der Fa. Hewlett und Packard nach dem log spline Model.

2.5.2. Übertragung der Patientendaten auf Computerkarten

Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse war eine Übertragung der Patientendaten auf Lochkarten notwendig. Hierfür wurde für jede Patientin der auf der folgenden

Seite dargestellte Erhebungsbogen ausgefüllt und dieser wiederum auf Lochkarten übertragen.

2.5.3. Statistische Auswertung

Die Errechnung der Mittelwerte, der Standardabweichung und des Standardfehlers sowie die Durchführung der U-Varianzteste für Kollektive mit unbekannter Verteilung erfolgte mit dem Computer des Instituts für medizinische Dokumentation und Datenverarbeitung der Universität Tübingen.

Computer-Erhebungsbogen

A	IDENTIFIKATION EINER LOCHKARTE	
A1	LFD.-NR. EINER PATIENTIN	1-3
B	MÜTTERLICHE DATEN	
B1	ALTER BEI NIEDERKUNFT	4-5
B2	PARITÄT	6
B3	SSW DER GEBURT	7-8
B4	ERKRANKUNGEN 0=keine Erkrankung 1=EPH-Gestose 2=Rh-Inkompatibilität 3=Diabetes mellitus	9
B5	GESTOSE-INDEX 0=nein 1-11=INDEX	1o-11
C	DATEN DES KINDES	
C1	APGAR 1'	12-13
C2	APGAR 5'	14-15
C3	APGAR 1o'	16-17
C4	GEWICHT IN g	18-21
C5	LÄNGE IN cm	22-23
C6	GESCHLECHT 1=MÄNNLICH 2= WEIBLICH	
C7	pH ART DER NABELSCHNUR	25-27
D	FRUCHTWASSER PARAMETER	
D1	SSW DER ENTNAHME	28-29
D2	FARBE 0=klar 1=milchig-trüb 2=gelb 3=grün	3o
D3	PROGESTERON IN ng/ml	31-34
D4	DHP IN ng/ml	35-37

3. MATERIAL

3.1. Geräte

(1) Multivortexer Modell 2601, Fa. SMI, USA

(2) Szintillationszähler Isocap300, Fa.Nuclear-Chicago, USA

(3) Zentrifuge Typ 5019, Fa. Heraeus Christ GmbH, Osterode

(4) Chromatographiesäule Quick Set, RIA-Charcoal Column, Innovative Laboratory Products, Ohio

(5) Rotator Typ 3025, Fa. GFL, Hannover

(6) Ultrazentrifuge Spinco, Modell L/L2, Fa. Beckman

(7) Gammazähler 1270 Rackgamma II, Fa. LKB

(8) Tischcomputer 9845 A, Fa. Hewlett u. Packard, Böblingen

(9) Kanülen Nr. 2, Braun Melsungen AG, Melsungen

(10) Polystyrolröhrchen No 105/16 S, Sarstedt, Nümbrecht

3.2. Chemikalien

(11) 5-α-Dihydroprogesterone (1,2-^{3}H(N)) NET 438, New England Nuclear, Boston

(12) Progesteron (1,2-^{3}H)NET 208, New England Nuclear, Boston

(13) 5-α-Pregnan-3,20-Dion, P2750, Fa. Steraloids, Pawling, N.Y.

(14) RIA-Kit Progesteron (^{125}J), Fa. Serono, Freiburg

(15) Diäthyläther (p.a., Fa. Merck, Darmstadt)

(16) Isooctan (purum, Fluka AG)

(17) Äthanol absolut (p.a., Fa. Merck, Darmstadt)

(18) Szintillationsflüssigkeit Unisolve 1, Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, England

(19) Complete Freud s Adjuvant, Difco Laboratories, Detroit

(2o) Aktivkohle Norit A, Fa. Serva, Heidelberg

(21) Säulenmaterial Chromatolithe B, Celite-Propylenglykol, Fa. bio Merieux, Lyon

3.3. Lösungen

(22) Gelatinepuffer

Stocklösung A:

68,99 g $NaH_2PO_4.H_2O$ (reinst, Fa. Merck)
1 mg Thiomersal (Fa. Serva)
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen und langsam lösen

Stocklösung B:

17,8 g $Na_2HPO_4.2\ H_2O$ (reinst, Fa. Merck)
1 mg Thiomersal (Fa. Serva)
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen und langsam lösen

Stocklösung C:

61,36 g NaCl (p.a., Fa. Merck)
1 mg Thiomersal (Fa. Serva)
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen und langsam lösen

Stocklösungen bei $4^{o}C$ aufbewahren

0,1% Gelatinepuffer

1 g Gelatine (reinst, Fa. Serva)
1 mg Thiomersal (Fa. Serva)
6,6 ml Stocklösung A
66,7 ml Stocklösung B
133,3 ml Stocklösung C
mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und
Gelatine bei 3o°C im Wasserbad lösen

bei 4°C aufbewahren

(23) Aktivkohlesuspension

2,5 g Norit A (Fa. Serva)
o,25 g Dextran T 7o (Fa. Pharmacia)
mit 5oo ml o,1% Gelatinepuffer auffüllen und
4 Stunden bei 4°C rühren lassen

Kohlesuspension bei 4°C aufbewahren und unmittelbar vor Gebrauch nochmals 1o Minuten rühren lassen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Kreuzreaktionen des Antikörpers 11o/5

In Tab. 2 sind die Kreuzreaktionen des Antikörpers mit insgesamt 24 untersuchten Steroidhormonen dargestellt.

Die hydroxylierten Steroide zeigten eine Kreuzreaktion von 3,2 bis 39,2 %. Die Kreuzreaktion mit Progesteron betrug 1oo %, die mit DHP 9o,7 %. Es mußte also ein Trennungsverfahren angewandt werden, bei dem die hydroxylierten Steroide eliminiert und Progesteron und 5α-Pregnan-3,2o-dion aufgetrennt werden konnten.

4.2. Säulentrennung von 5α-Pregnan-3,2o-dion und Progesteron

Durch Verwendung des unpolaren Lösungsmittels Isooctan wurde erreicht, daß die hydroxylierten Steroide am Säulenbeginn festgehalten wurden.

Abb. 1 zeigt das Elutionsverhalten von radioaktiv markiertem 5α-DHP und Progesteron (siehe 3.2. (11) und (12)).
Die ersten 2 ml des Eluats konnten verworfen werden, da sie keine Aktivität, d. h. kein Hormon enthielten.

Wurden als DHP-Fraktion die nachfolgenden 2 ml verwendet, so betrug die durchschnittliche Wiederfindung 64 % (s= ± 5,68, a = 72), wobei hier sicherlich ein kleiner Teil Progesteron enthalten war.

Um eine Progesteron-Verunreinigung möglichst auszuschließen, wurden nach dem Vorlauf nur 1,5 ml Eluat aufgefangen und hieraus das 5α-DHP bestimmt. Dabei betrug die durchschnittliche Wiederfindung 51,4 % (s=± 5,o6 %, n = 68).

Tab. 3: Kreuzreaktivität des Antikörpers 11o/5 mit 24 Steroidhormonen

Steroidhormon	Kreuzreaktivität (%)
Progesteron	1oo
4-Pregnen-11β-17α,21 triol-3,2o-dion	o
4-Pregnen-16α-ol-3,2o-dion	o
4-Pregnen-21-ol-3,2o-dion	26,5
4-Pregnen-17α,21-diol-3,2o-dion	1o,6
4-Pregnen-2oβ-ol-3-on	15,9
4-Pregnen-11β-ol-3,2o-dion	2o,3
4-Pregnen-11α-ol-3,2o-dion	29,o
4-Pregnen-2oα-ol-3-on	7,9
5α-Pregnan-3β-ol-2o-on	39,2
5α-Pregnan-3,2o-dion	9o,7
Dihydroequilin	o
Equilinepoxid	o
Equilin	o
4-Androsten-17β-ol-3-on	5,3
4-Androsten-3,17-dion	o
5α-Androstan-3α,17β-diol	3,2
5α-Androstan-3 ,17β-diol	o
5α-Androstan-17β-ol-3-on	6,4
5α-Androstan-3,17-dion	4,2
5α-Androstan-3α,17β-diol	5,3
Östriol	o
Östradiol	4,7
Östron	o

Die durchschnittliche Progesteron-Wiederfindung belief sich auf 74,4 % (SD = 6,7,n = 2o). Diese Werte liegen etwas höher als bei MILEWICH et al.,die 1975 bei säulenchromatographischer Trennung der beiden Hormone eine Wiederfindung von 6o % für Progesteron und 4o % für 5α-Pregnan-3,2o-dion beschrieben.

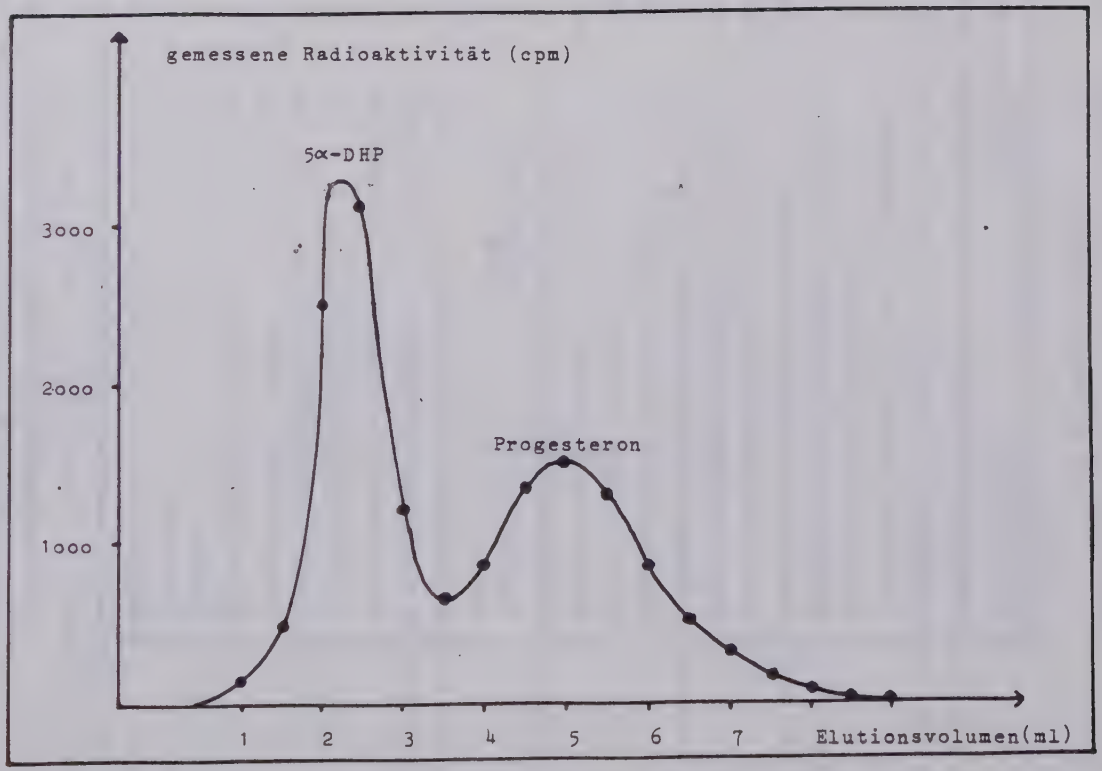
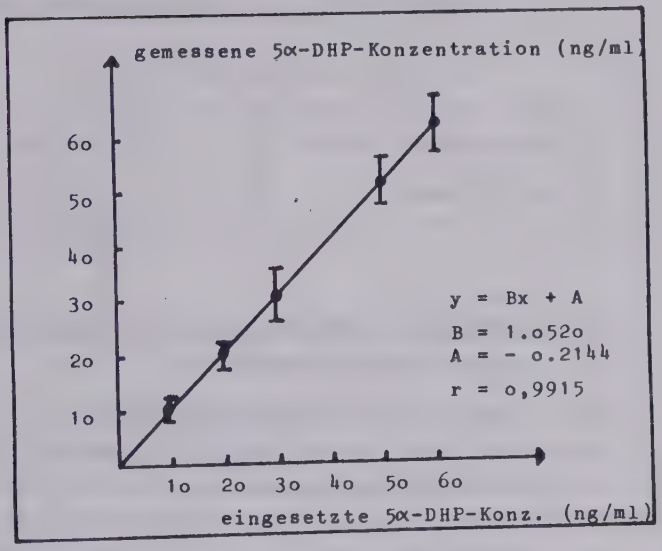


Abb. 1: Säulenchromatographische Trennung eines Gemisches aus radioaktiv markiertem 5α-DHP und Progesteron in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen.

4.3. Qualitätskontrolle der 5α-DHP-Bestimmung

Abb. 2 zeigt die Valiabilitätskontrolle für die 5α-DHP-Bestimmung.

Die Kurvengleichung ergab $y = 1,052x - 0,2144$
Ein Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,9915$ weist auf eine hinreichende Korrelation hin.



Die Intraassayvarianz der Kontrollen mit 10 ng/ml betrug 5,31 % (Mittelwert 9,76 ± 2,362 ng/ml, n = 20), die mittlere Varianz aller 5 untersuchten Konzentrationen betrug 11,6 % (n = 100).

Die Interassayvarianz einer Plasmaprobe, die über mehrere Monate mitgemessen wurde, betrug 12,0 %.

4.4. Bestimmung des Antikörpertiters für das Antiserum 11o/5

Tabelle 4 zeigt das Ausmaß der Nullbindung für drei verschiedene Antikörperverdünnungen.

Hieraus war zu ersehen, daß für eine Bindung von 4o-5o % eine Verdünnung von 1:7oo eingesetzt werden mußte.

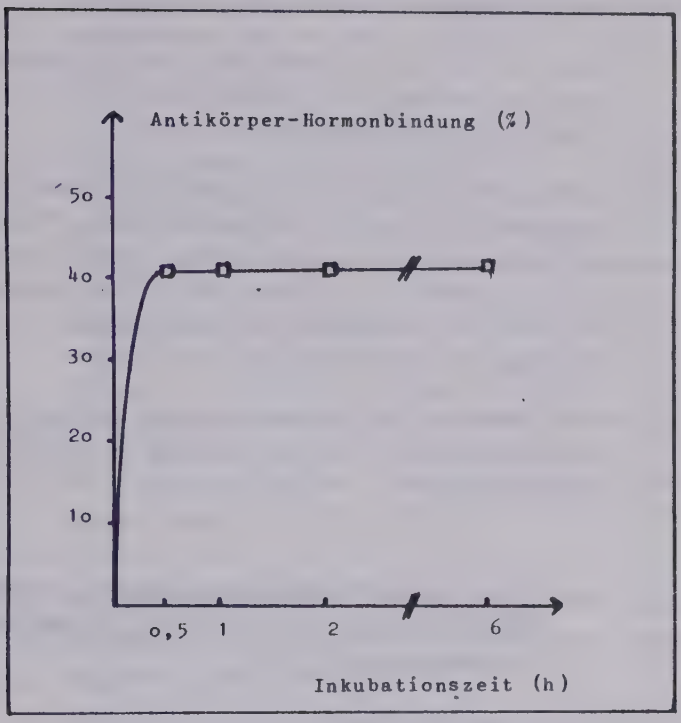
Tab. 4 Nullbindung (= BO/T, siehe Tab. 2) in Abhängigkeit von der Antikörperverdünnung

Antikörperverdünnung	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
Nullbindung	88 %	55 %	35 %

4.5. Abhängigkeit der Nullbindung von der Inkubationsdauer des Radioimmunoassays

Abb. 3 zeigt die Antikörperhormonbindung nach halb-, ein-, zwei- bzw. sechsstündiger Inkubation. Bereits nach 3o-minütiger Inkubationsdauer wurde eine Bindung von ca. 4o % erreicht, die sich bei längerer Inkubation nur unwesentlich änderte. Zur Vereinheitlichung der Untersuchungen wurde immer eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewählt.

Abb. 3 Antikörper-Hormonbindung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Radioimmunoassays



4.6. Klinische Daten des Gesamtkollektivs und des Normalkollektivs

In Tab. 5 und Tab. 6, S. 38 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler der Mittelwerte und die Anzahl der Proben für das Gesamtkollektiv und das Normalkollektiv zusammengestellt.

Insgesamt wurden 241 Fruchtwasserproben schwangerer Frauen untersucht. Von diesen erfüllten 131 die Kriterien des Normalkollektivs.

Das durchschnittliche Alter der Gebärenden ist im Normalkollektiv mit 32 Jahren gegenüber 31 Jahren im Gesamtkollektiv deshalb erhöht, weil hier die Gruppe der Frauen, bei denen ein Alter von mehr als 35 Jahren die Indikation zur Amniozentese war, relativ überwiegt.

Beim Vergleich der klinischen Daten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Gesamtkollektiv und Normalkollektiv.

4.7. Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler der Mittelwerte und Anzahl der Proben für 5α-DHP. und Progesteron

4.7.1. Gesamtkollektiv

Für das Gesamtkollektiv, also alle gemessenen Fruchtwasserproben unabhängig von Gestationsalter, Schwangerschaftsverlauf, Geburtsverlauf, mütterlichen und kindlichen Daten, ergibt sich ein 5α-DHP-Wert von 7,9 ng/ml und ein rund fünffach höherer Wert von 41,3 ng/ml für Progesteron. Damit ergibt sich ein Verhältnis von Progesteron zu 5α-DHP von o,19 (Tab. 5, S. 38)

4.7.2. Normalkollektiv

Die Gewinnung von Fruchtwasserproben normaler Schwangerschaften aus der Frühschwangerschaft durch Amniozentese (16. bis 18. SSW) und am Ende der Schwangerschaft zum Zeitpunkt der Geburt (38. bis 42. SSW) ermöglichen eine Untersuchung der Konzentration von Progesteron und 5α-DHP in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

Die Ergebnisse (Tab. 7 und 8, S. 39) weisen einen signifikanten Abfall des Progesteron im Verlauf der Schwangerschaft von einem mittleren Wert von 71,2 ng/ml in der 16. bis 18. Woche auf 31,6 ng/ml am Termin auf ($p<0,01$). Dies entspricht 44,4 % des früheren Werts.

5α-DHP verhält sich ähnlich wie Progesteron. Es fällt signifikant von einem mittleren Wert von 12,6 ng/ml in der 16. bis 18. Woche auf 6,1 ng/ml am Termin ab ($p<0,01$). Dies entspricht 48,4 % des früheren Werts.

In den Wochen 16 bis 18 beträgt das Verhältnis von Progesteron zu 5α-DHP 0,18, in der 38. bis 42. Woche liegt der Wert bei 0,19.

In Tab. 8 (S.39) sind die Ergebnisse der Progesteronmessung, in Tab. 10 die des 5α-DHP nach Entnahmewochen aufgeschlüsselt dargestellt.

Abb. 5 (S. 41) gibt diese Resultate für die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte des Progesteron, Abb. 6 diejenigen für 5α-DHP graphisch wieder.

4.7.3. Pathologische Kollektive

4.7.3.1. EPH-Gestose

15 Fälle von EPH-Gestose mit einem Gestose-Index von mehr als drei wurden untersucht. Neun davon stammen

aus Schwangerschaftswochen um den Termin. Sie lassen einen Vergleich mit dem Ergebnis des Normalkollektivs zum gleichen Zeitraum zu. (Tab. 11 und 12, S. 42)

Der mittlere Progesteronwert liegt bei EPH-Gestose mit 18,o ng/ml bei nur 56,9 % des Normalwerts, der mittlere 5α-DHP-Wert mit 9,o ng/ml 47,5 % über dem Normalwert von 6,1 ng/ml.

Es läßt sich der Trend feststellen, daß bei EPH-Gestose zur Zeit der Geburt der Progesteronspiegel im Fruchtwasser erniedrigt, hingegen der 5α-DHP-Spiegel erhöht ist. Progesteron und sein Metabolit 5α-DHP scheinen sich in diesem Falle nicht positiv korreliert zu verhalten, wie es für das Gesamtkollektiv nachgewiesen werden kann (4.1o)

4.7.3.2. Rh-Inkompatibilität

27 untersuchte Fälle von Rh-Inkompatibilität von der 28. bis zur 39. Schwangerschaftswoche weisen einen Abfall des Spiegels beider Hormone mit fortschreitender Schwangerschaft auf. (Tab. 13 und 14, S. 43)

4.7.3.3. Diabetes mellitus

Sieben Diabetes mellitus-Fälle von der 35. bis zur 41. Schwangerschaftswoche bestätigen in der Tendenz das Ergebnis des Normalkollektivs: zum Ende der Schwangerschaft fallen die Werte für Progesteron und 5α-DHP ab und beide Hormone verhalten sich positiv korreliert. (Tab. 15 und 16, S. 44) Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zum Normalkollektiv nachweisen.

4.7.3.4. Frühgeburtlichkeit

Die Ergebnisse dieser 35 Fälle aus der 24. bis 37. Schwangerschaftswoche lassen einen direkten Vergleich mit dem Normalkollektiv nicht zu, da dieses per definitonem erst von der 38. Woche an beginnt.

Die Werte für Progesteron liegen in der 35. und 36. Woche bei 44,3 ng/ml (n = 12), in der 37. Woche bei 35,6 ng/ml (n = 17)(Tab. 17, S. 45). Der Wert des Normalkollektivs der 38. bis 42. Woche beträgt 31,6 ng/ml. Eine signifikante Abweichung zwischen beiden Kollektiven besteht nicht.

Die Messung des 5α-DHP ergibt einen Wert von 6,6 ng/ml in der 35. und 36. Woche (n=13). In der 37. Woche beträgt er 6,8 ng/ml (n=17) (Tab. 18, S. 45). Der Wert des Normalkollektivs für die 38. bis 42. Woche liegt bei 6,1 ng/ml. Auch hier läßt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven nicht begründen.

4.7.3.5. Azidosekollektiv

Bei Neugeborenen, deren pH-Wert des Nabelschnurbluts während der Geburt unter 7,25 sank, wurden in der Tendenz höhere Progesteronwerte und signifikant höhere 5α-DHP-Werte im Fruchtwasser, das während der Eröffnungsperiode abgenommen wurde, gemessen. (Tab. 19 und 2o, S. 46).

Bei der Progesteronmessung liegt der mittlere Wert der 14 Proben mit 5o, 8 ng/ml 62 % über dem Wert des Normalkollektivs von 31,6 ng/ml.

Die 5α-DHP-Messung ergibt einen mittleren Wert von 9,5 ng/ml für 16 Proben. Dieser Wert liegt 55,7 % über dem Wert des Normalkollektivs von 6,1 ng/ml. Der U-Test ergibt eine eindeutige Signifikanz. p (zweiseitig) liegt bei 2,782 %. Auf dem 5,000 %-Niveau wird die Nullhypothese abgelehnt.

4.8. Untersuchung des Einflusses mütterlicher Parameter auf die Hormonkonzentration

4.8.1. Parität der Mutter

Um zu untersuchen, ob die Parität der Mutter einen Einfluß auf das Verhalten der beiden gemessenen Hormone hat, wurde das Normalkollektiv in die Gruppe der Primiparae und die der Multiparae unterteilt. (Tab. 21 und 22, S. 47).

Bezüglich des Progesteron ergeben sich weder für die 16. bis 18. SSW noch für die 38. bis 42. SSW signifikante Abweichungen von den Werten des Normalkollektivs.

Ebenfalls das 5α-DHP zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration, verglichen mit den Werten des Normalkollektivs für beide Gruppen.

Die Parität der Mutter scheint also keinen Einfluß auf die Konzentration des Progesteron und des 5α-DHP im Fruchtwasser zu haben.

4.9. Untersuchung des Einflusses kindlicher Parameter auf die Hormonkonzentration

4.9.1. Geschlecht des Kindes

Um zu untersuchen, ob das Geschlecht des Kindes einen

Einfluß auf das Verhalten des Progesteron und des 5α-DHP im Fruchtwasser hat, wurde das Normalkollektiv in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe besteht aus Patientinnen, die einen Sohn, eine andere aus Patientinnen, die eine Tochter geboren haben (Tab. 23 und 24, S. 48).

Der Progesteronwert differiert in der 16. bis 18. SSW nicht signifikant vom Wert des Normalkollektivs von m=71,2 ng/ml. Ebenso bestehen keine signifikanten Unterschiede in der 38. bis 42. SSW vom mittleren Wert von 31,6 ng/ml des Normalkollektivs.

Dieselbe Aussage läßt sich für das 5α-DHP treffen. Auch hier bestehen keine signifikanten Unterschiede in beiden Wochenblöcken zu den Werten des Normalkollektivs von m = 12,6 ng/ml und m = 6,1 ng/ml.

Das Geschlecht des Kindes scheint also keinen signifikanten Einfluß auf die Konzentration der beiden gemessenen Hormone im Fruchtwasser zu haben.

4.1o. Korrelation zwischen 5α-DHP und Progesteron

5α-DHP entsteht durch die Wirkung des Enzyms 5α-Reduktase aus Progesteron (MILEWICH 1977). Es ist von großem Interesse zu erfahren, ob eine Beziehung zwischen den Spiegeln der beiden Hormone im Fruchtwasser besteht und welcher Art diese Beziehung ist.

Tatsächlich konnte bei der statistischen Untersuchung von 232 Proben aus dem Gesamtkollektiv eine signifikante Beziehung festgestellt werden: 5α-DHP und Progesteron verhalten sich positiv korreliert (Abb. 4, S. 37).

Die Geradengleichung der Regressiongeraden lautet

$$y = 0{,}091\ x + 4{,}13$$

wobei y dem Progesteronwert in ng/ml und x dem 5α-DHP-Wert in ng/ml entspricht. Der Korrelationskoeffizient nach PEARSON beträgt R = 0,5312. Die Wahrscheinlichkeit p ist kleiner als 0,001. Die zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten herangezogene FISHER'sche Z-Transformation ergibt einen Wert Z = 0,592.

Es besteht also für die Konzentrationen von Progesteron und 5α-DHP im Fruchtwasser eine sehr gute positive Korrelation.

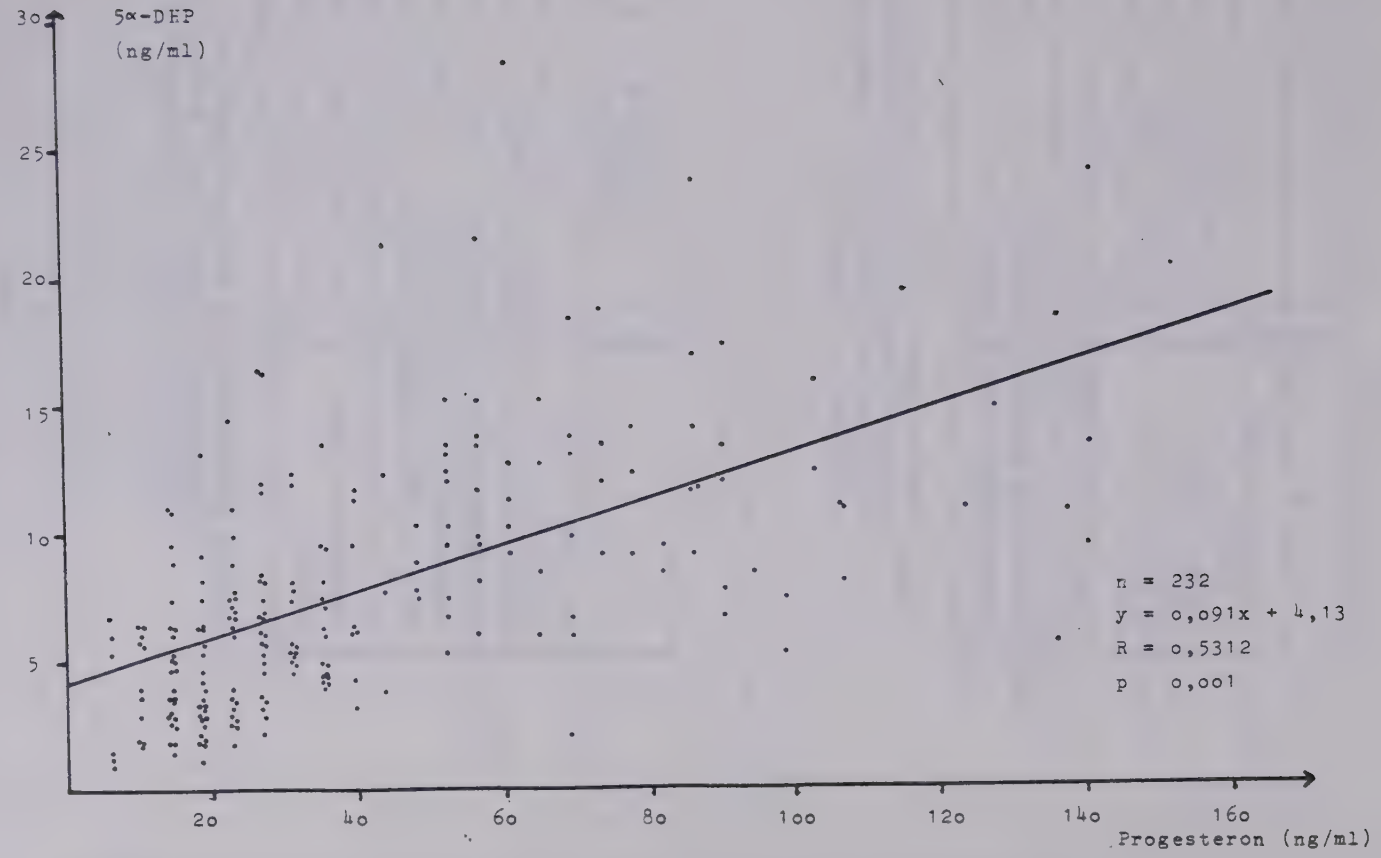


Abb.4: Gesamtkollektiv, Relation von 5α-DHP zu Progesteron im Fruchtwasser.

	m	SD	SEM	n
Alter der Mutter in Jahren	31	7,3	o,47	239
SSW der Geburt	38,2	5,4	o,35	241
Geburtsgewicht (g)	3235	63o	41,1	235
Länge (cm)	49,9	3,7	o,25	224
pH_{art} der Nabelschnur	7,3	o,o7	o,oo7	1o4
Progesteron (ng/ml)	41,3	31,7	2,1	238
5α-DHP (ng/ml)	7,9	5,5	o,36	237

Tab. 5: GESAMTKOLLEKTIV. Klinische Daten und Ergebnisse. Mittelwerte (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Anzahl der Proben (n).

	m	SD	SEM	n
Alter der Mutter in Jahren	32	7,2	o,64	128
SSW der Geburt	4o,o	1,2	o,11	131
Geburtsgewicht (g)	343o	431	37,7	131
Länge (cm)	51,o	2,1	o,18	131
pH_{art} der Nabelschnur	7,3	o,1	o,o17	36
Progesteron (ng/ml)	49,3	34,3	3,o	13o
5α-DHP	9,o	5,7	o,5	129

Tab. 6: NORMALKOLLEKTIV. Klinische Daten und Ergebnisse. Mittelwerte (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Anzahl der Proben (n).

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	16 - 18	71,2	33,3	4,3	59
	38 - 42	31,6	22,7	2,8	68

Tab. 7: NORMALKOLLEKTIV. Progesteronwerte. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe, Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	16 - 18	12,6	5,8	o,8	59
	38 - 42	6,1	3,5	o,4	67

Tab. 8: NORMALKOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW, Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	16	69,o	33,o	7,4	2o
	17	76,5	28,o	6,1	21
	18	67,4	4o,o	9,4	18
	38	33,3	27,6	9,8	8
	39	28,o	21,2	6,1	12
	4o	31,4	21,2	4,5	22
	41	34,7	22,8	6,1	14
	42	31,1	26,6	7,7	12

Tab. 9: NORMALKOLLEKTIV. Progesteronwerte. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	16	13,8	5,1	1,1	2o
	17	12,o	4,1	o,9	21
	18	12,o	7,9	1,9	18
	38	6,1	3,5	1,2	8
	39	4,5	3,7	1,1	12
	4o	6,2	3,3	o,7	22
	41	7,o	2,8	o,8	13
	42	6,5	4,6	1,2	12

Tab. 1o: NORMALKOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

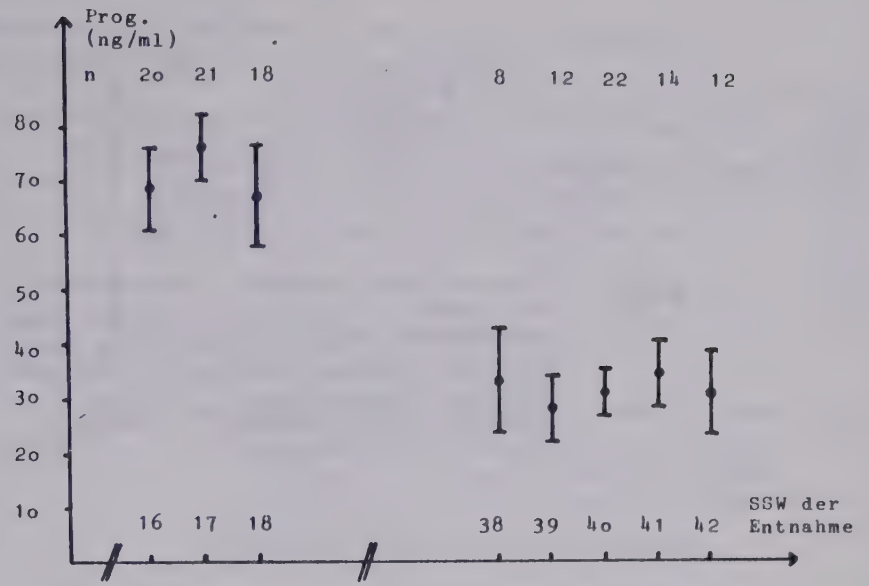


Abb. 5: NORMALKOLLEKTIV. Mittelwerte des Progesteron in ng/ml, Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n) in Abhängigkeit von der Entnahmewoche.

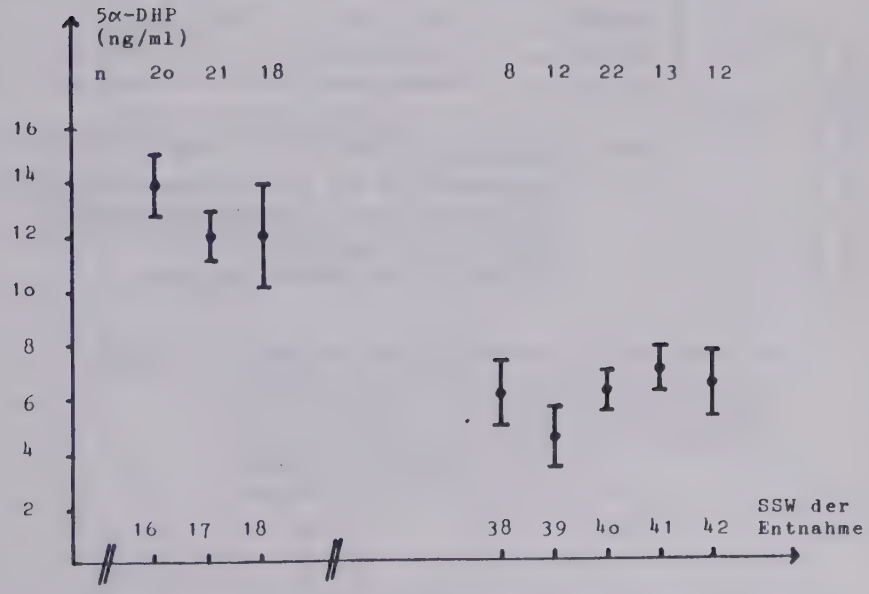


Abb. 6: NORMALKOLLEKTIV. Mittelwerte des 5α-DHP in ng/ml, Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n) in Abhängigkeit von der Entnahmewoche.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	28 - 37	47,1	18,o	8,1	5
	38 - 41	18,o	4,2	1,4	9

Tab. 11: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. Progesteronwerte bei EPH-Gestose.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	28 - 37	8,o	3,1	1,3	6
	38 - 41	9,o	1,3	o,4	9

Tab. 12: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte bei EPH-Gestose.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	28 - 31	41,2	19,3	6,4	9
	32 - 34	28,5	8,4	2,4	12
	35 - 37	2o,1	11,o	3,5	1o
	38 - 39	18,o	1,4	o,6	6

Tab. 13: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. Progesteronwerte bei Rh-Inkompatibilität.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	28 - 31	6,5	5,3	1,9	8
	32 - 34	5,8	3,5	1,o	12
	35 - 37	4,o	1,5	o,5	1o
	38 - 39	5,6	1,7	o,7	6

Tab. 14: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte bei Rh-Inkompatibilität.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM)und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	35 - 37	53,5	26,o	16,3	2
	38 - 41	25,7	1,6	o,7	5

Tab. 15: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. Progesteronwerte bei Diabetes mellitus.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	35 - 37	9,8	5,5	3,9	2
	38 - 41	7,4	o,9	o,4	5

Tab. 16: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte bei Diabetes mellitus.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	24 - 34	38,o	22,o	9,8	5
	35 - 36	44,3	45,2	13,1	12
	37	35,6	2o,o	4,9	17

Tab. 17: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. Progesteronwerte bei Frühgeburtlichkeit.
Entnahmewochen der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	24 - 34	5,8	4,3	1,9	5
	35 - 36	6,6	2,3	o,6	13
	37	6,8	3,2	o,8	17

Tab. 18: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. 5α-DHP-Werte bei Frühgeburtlichkeit.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	38 - 42	5o,8	17,9	4,8	14

Tab. 19: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. Progesteronwerte bei pH < 7,25 im Nabelarterienblut. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM)und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	38 - 42	9,5	2,3	o,6	16

Tab. 2o: PATHOLOGISCHES KOLLEKTIV. 5α-DHP Werte bei pH < 7,25 im Nabelarterienblut. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	Parität	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	16 - 18	Primiparae	65,4	37,4	11,3	11
		Multiparae	72,5	32,6	4,7	48
	38 - 42	Primiparae	32,o	23,o	4,6	25
		Multiparae	32,o	22,8	3,5	42

Tab. 21: NORMALKOLLEKTIV. Progesteronwert und Parität. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	Parität	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	16 - 18	Primiparae	12,9	4,2	1,3	11
		Multiparae	12,6	6,1	o,9	48
	38 - 42	Primiparae	6,2	4,o	o,8	26
		Multiparae	6,1	3,3	o,5	4o

Tab. 22: NORMALKOLLEKTIV. 5α-DHP-Wert und Parität. Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW), Mittelwert (m), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Anzahl der Proben (n). Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

	SSW der Entnahme	Geschlecht	m	SD	SEM	n
Progesteron (ng/ml)	16 - 18	♂	69,9	36,6	6,4	33
		♀	72,8	29,4	5,8	26
	38 - 42	♂	34,1	23,3	3,7	4o
		♀	28,2	21,8	4,1	28

Tab. 23: NORMALKOLLEKTIV. Progesteronwert und Geschlecht
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW),
Mittelwert (m), Standardabweichung (SD),
Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und
Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für Progesteron in ng/ml.

	SSW der Entnahme	Geschlecht	m	SD	SEM	n
5α-DHP (ng/ml)	16 - 18	♂	13,1	7,1	1,2	33
		♀	12,o	3,5	o,7	26
	38 - 42	♂	6,o	3,4	o,5	41
		♀	6,2	3,7	o,8	26

Tab. 24: NORMALKOLLEKTIV. 5α-DHP-Wert und Geschlecht.
Entnahmewoche der Fruchtwasserprobe (SSW),
Mittelwert (m), Standardabweichung (SD),
Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und
Anzahl der Proben (n).
Ergebnisse für 5α-DHP in ng/ml.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von Progesteron und 5α-DHP im Fruchtwasser von 241 normalen und pathologischen Schwangerschaften zu verschiedenen Zeiten der Schwangerschaft bestimmt.

Anhand von 131 Fällen des Normalkollektivs konnte nachgewiesen werden, daß die Konzentration von Progesteron und 5α-DHP von 71,2 ng/ml und 12,6 ng/ml in der 16. bis 18. Schwangerschaftswoche auf 31,6 ng/ml und 6,1 ng/ml zum Zeitpunkt der Geburt in der 38. bis 42. Schwangerschaftswoche signifikant abfallen ($p < 0,01$).

ZANDER und VON MÜNSTERMANN wiesen 1956 zum ersten Mal Progesteron spektralphotometrisch im Fruchtwasser nach. In den sechziger Jahren veröffentlichten HARBERT et al. (1964), LURIE et al. (1966), WIEST (1967) und SCHINDLER und SITTERI (1968) Bestimmungen des Progesteronspiegels im Fruchtwasser zum Zeitpunkt der Geburt. Die Anzahl der untersuchten Fälle betrug maximal vierzehn, die gemessenen Progesteronkonzentrationen schwankten zwischen 29 und 124 ng/ml.

1971 erschienen zwei Arbeiten (YOUNGLAI et al., JOHANNSON und JONASSON), die nicht nur eine größere Anzahl von Fruchtwasserproben normaler Schwangerschaften aufwiesen, sondern auch die Änderung des Progesteronspiegels im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter untersuchten. Die Messung wurde in beiden Arbeiten durch eine kompetitive Proteinbindungsmethode durchgeführt. YOUNGLAI et al. (1971) bestimmten den Verlauf von der 11. bis zur 40. SSW und konnten die schon von ZANDER und VON MÜNSTERMANN (1956) geäußerte Vermutung bestätigen, daß der Progesteronspiegel im Fruchtwasser im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich abfällt.

Die hier erhaltenen Ergebnisse stehen mit diesem Result in Einklang, die Werte der 16. bis 18. SSW sind signifikant höher als die Werte der 38. bis 42. SSW ($p < o,o$ Der Wert für die frühe Schwangerschaft ist etwas höher als vergleichbare Werte der beiden Arbeiten. Für die Werte am Termin ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit der hier bestimmten Konzentration von 31,6 ng/ YOUNGLAI et al. geben für die 36. bis 4o. Woche einen Wert von 29,55 ± 12,25 ng/ml (n=44) an, JOHANNSON und JONASSON für die 37. bis 4o. Woche einen Wert von 26,4 ng/ml (n=34).

Von der Mitte der siebziger Jahre an werden die bisherigen Bestimmungsmethoden zugunsten der äußerst spezifischen Methode des Radioimmunoassay verlassen.

KOREN et al. untersuchten 1976 den Progesteronspiegel im Fruchtwasser der 15. bis 2o. SSW anläßlich des Prostaglandin $F_{2\alpha}$-induzierten Abortes von 11 Schwangeren. Vor dem Beginn der Behandlung betrug die mittlere Konzentration 51 ± 21 ng/ml. Sie liegt damit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie der in dieser Arbeit bestimmte Wert für die 16. bis 18. SSW.

Die von WARNÉ et al. (1977) bestimmten Werte eines Normalkollektivs im Fruchtwasser liegen mit 25 ng/ml (n=33) von der 16. bis 19. SSW und 11 ng/ml (n=2o) von der 34. bis 4o. SSW niedriger als die bisher zitierten vergleichbaren Werte anderer Autoren, zeigen aber deutlich den beschriebenen Konzentrationsabfall im Verlauf der Schwangerschaft an.

Der von MENNUTI et al. (1977) sowie von WU et al. (1979) in einem großen Normalkollektiv (n=99) der 14. bis 22. SSW anläßlich einer Amniozentese zur Geschlechtsbestimmung erhaltene Wert von 55 ± 28 ng/ml

entspricht in der Größenordnung dem hier bestimmten Wert zur vergleichbaren Zeit. Leider sind die Kriterien, die zur Auswahl des Kollektivs führten, nicht angegeben.

NAGAMANI et al. (1979) konnten bei einem Normalkollektiv von 1o1 Proben ebenso wie in dieser Arbeit signifikant höhere Werte für Progesteron zwischen der 14. und 2o. SSW messen als am Termin.

Zu vollkommen anderen Ergebnissen als die bisher zitierten Autoren, kommen SIPPELL et al. (198o). Sie beschreiben in einem Normalkollektiv von 7o Patientinnen einen zunächst leichten Anstieg des Progesteronspiegels von 14,7 ng/ml in der 14. Woche bis hin zur 3o. Woche, der dann signifikant wird und ein Maximum von 32,4 ng/ml zwischen der 36. und 38. Woche erreicht. Anschließend erfolgt ein signifikanter Abfall auf 19,2 ng/ml am Termin. In Übereinstimmung mit den übrigen diskutierten Arbeiten, konnten in dieser Arbeit weder derart niedrige Werte in der frühen Schwangerschaft, noch ein Abfall von der 38. bis zur 42. Woche auf einen dem Ausgangswert ähnlichen Wert festgestellt werden, sondern es wurde ein signifikant höherer Wert in der frühen Schwangerschaft als am Termin besimmt.

Bisher ist noch nicht erforscht, ob die EPH-Gestose mit einer veränderten Konzentration des Progesteron im Fruchtwasser einhergeht. JONASSON und JOHANSSON (1971) berichten von drei Patientinnen mit Präeklampsie, bei denen keine Abweichungen vom Normbereich auffielen. Ob die hier festgestellte Tendenz zu erniedrigten Progesteronkonzentrationen am Termin bei neun Gestose-Patientinnen den wirklichen Sachverhalt widerspiegelt, kann nur durch Beobachtungen an einem größeren pathologischen Kollektiv überprüft werden.

Den Zusammenhang von Rh-Imkompatibilität und Progesteronspiegel im Fruchtwasser haben JONASSON und JOHANSSON (1971) und SCHINDLER und KELLER (1973) untersucht. In ihren Arbeiten kommen sie zu der Überzeugung, daß die untersuchten Fälle von Rh-Inkompatibilität nicht mit einem veränderten Progesteronspiegel einhergehen. Dies entspricht dem hier beschriebenen Ergebnis.

Eine genauere Untersuchung über den Progesteronspiegel im Fruchtwasser bei Diabetes mellitus liegt bisher nicht vor. JONASSON und JOHANSSON (1971) berichten von einem Fall, der, wie bei den hier vorliegenden Untersuchungen, keine signifikante Abweichung vom Normalwert aufweist.

Über den Einfluß der Frühgeburtlichkeit und der fetalen Azidose auf den Progesteronwert im Fruchtwasser sind in der Literatur bisher keine Ergebnisse bekannt.

Untersuchungen über den Einfluß des Geschlechts des Kindes auf die Progesteronkonzentrationen im Fruchtwasser eines Normalkollektivs haben WARNE et al. (1977), MENNUTI et al. (1977) und NAGAMANI et al. (1979) angestellt. Alle Autoren gelangen zu dem Resultat, daß ein signifikanter Einfluß nicht besteht. Dies entspricht dem hier erhaltenen Ergebnis.

Untersuchungen über den Zusammenhang von Progesteronspiegel im Fruchtwasser und der Parität der Mutter sind in der Literatur nicht bekannt. Nach den hier vorgenommenen Untersuchungen besteht dieser Zusammenhang nicht.

Über die Isolierung und die quantitative Bestimmung von 5α-DHP im Fruchtwasser wird in dieser Arbeit zum

ersten Mal berichtet. Da keine vergleichbaren Veröffentlichungen vorliegen, läßt sich die Übereinstimmung mit den tatsächlich vorliegenden Verhältnissen nur schwer überprüfen.

Hinzuweisen ist jedoch auf die ermittelte gute positive Korrelation zwischen 5α-DHP und Progesteron im Fruchtwasser ($p < 0{,}001$) und das ähnliche Verhältnis beider zu verschiedenen Zeiten der Schwangerschaft; Ergebnisse, die die Verwandtschaft der beiden Hormone im Stoffwechsel repräsentieren könnten.

Bei Fällen mit fetaler Azidose ergab sich ein signifikant höherer Spiegel von 5α-DHP bei tendenziell höheren Progesteronwerten. Interessant ist in diesem Zusammenhang der von TANNICH (1983) beobachtete erhöhte 5α-DHP-Spiegel im venösen und arteriellen Nabelschnurblut bei Azidose des Feten.

Im pathologischen Kollektiv von neun EPH-Gestose-Patientinnen am Termin, ließ sich die Tendenz zu erhöhten 5α-DHP-Werten bei erniedrigten Progesteronwerten im Fruchtwasser feststellen. Nach den in der Einleitung erwähnten Untersuchungen von EVERETT et al. (1978) hat das 5α-DHP die Fähigkeit, die bei EPH-Gestose mit Hypertonus gestörte Refraktärität gegenüber dem vasopressorischen Effekt des Angiotensin II wieder herzustellen. Den für die Genese der EPH-Gestose wahrscheinlich wichtigen Änderungen im Progesteronmetabolismus könnte die in dieser Arbeit vermutete veränderte Relation zwischen Progesteron und 5α-DHP im Fruchtwasser entsprechen. Ob eine solche Änderung des Progesteronmetabolismus wirklich besteht oder nicht, kann nur durch Untersuchungen an einem größeren pathologischen Kollektiv verifiziert werden.

Abschließend bleibt noch der Zusammenhang der im Rahmen dieser Arbeit im Fruchtwasser untersuchten Hormone mit der in der Einleitung erörterten Vorstellung über den Beginn der Geburt zu diskutieren.

PULKKINEN und ENKOLA (1972) zeigten, daß die Progesteronkonzentration in den fetalen Membranen weit höher ist als im Fruchtwasser, und daß innerhalb der fetalen Membranen am Termin ein Progesterongradient besteht, so daß plazentanah höhere Konzentrationen bestehen als distal. Der Schluß liegt nahe, daß das myometrial wirksame Progesteron nicht über das Fruchtwasser dorthin gelangt, sondern vermutlich entlang der lipidreichen fetalen Membranen wandert und vor dort aus in das Myometrium eindringt. Doch es scheint noch ein anderer Mechanismus von Bedeutung zu sein:

GIBB et al. (1980) wiesen die Synthese von Progesteron aus Pregnenolon in fetalen Membranen der 38. bis 40. Woche nach Wehentätigkeit in vitro nach. Diese Reaktion ist in fetalen Membranen vor Wehenbeginn nur potentiell vorhanden und konnte nach Ausschalten eines Inhibitors in Gang gesetzt werden. Während der Wehen scheint dieser Inhibitor wegzufallen und die Progesteronsynthese steigt an.

Wie diese Erkenntnisse mit der von MILEWICH et al. (1977, 1979) geäußerten These des lokalen Progestoronentzugs durch ein proteinbindendes Hormon als Startpunkt myometrialer Kontraktionen zu vereinbaren ist, bleibt vorerst unklar. Nach den Untersuchungen von GIBB et al. ist es jedenfalls möglich, daß während der Wehen in den fetalen Eihäuten neben der Plazenta ein zweiter Ort der Progesteronsynthese entsteht.

Vielleicht korrespondiert mit dieser Erkenntnis die Beobachtung von KOREN et al. (1976), daß der Progesteronspiegel im Fruchtwasser nach intra-amniotischer Prostaglandin $F_{2\alpha}$- Applikation im Mittel um 41 ng/ml in drei Stunden ansteigt.

Die für den Beginn der Geburt relevanten metabolischen Vorgänge spielen sich innerhalb von Stunden ab und sind durch Messungen, die Wochengruppen zusammenfassen, nicht wiederzugeben. Will man die Rolle des Progesteron und seiner Metaboliten im Fruchtwasser bei diesen Vorgängen näher kennenlernen, sind daher Messungen in kurzen Abständen erforderlich.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß sowohl die Ursache, als auch die Wirkung der korrelierten Konzentrationsabnahme von Progesteron und 5α-DHP im Fruchtwasser im Verlauf der Schwangerschaft, ein nach wie vor ungelöstes Rätsel darstellt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Konzentrationen von Progesteron und 5α-DHP wurden im Fruchtwasser von 241 Schwangeren zu verschiedenen Zeiten der Schwangerschaft radioimmunologisch bestimmt. 131 Fälle davon erfüllten die Kriterien des Normalkollektivs.

Über die Isolierung und die quantitative Bestimmung von 5α-DHP im Fruchtwasser wird in dieser Arbeit zum ersten Mal berichtet.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Resultate:

1. Es wurde eine Extraktionsmethode und ein Radioimmunoassay für das 5α-DHP erarbeitet und der hierfür verwendete Antikörper charakterisiert.

   Der Korrelationskoeffizient der Validitätskurve betrug o,99, die Intraassayvarianz 5,3 %, die Interassayvarianz 12 %.

2. Für das Gesamtkollektiv besteht eine sehr gute Korrelation ($R = o,5312$, $p < o,oo1$) zwischen Progesteron und 5α-DHP.

3. Für das Normalkollektiv ergeben sich mit 71,2 ng/ml für Progesteron und 12,6 ng/ml für 5α-DHP von der 16. bis 18. SSW signifikant höhere Konzentrationen als für die 38. bis 42. SSW, in denen Progesteron mit 31,6 ng/ml und 5 -DHP mit 6,1 ng/ml bestimmt wurden ($p < o,o1$).

4. Bei neun Fällen von EPH-Gestose zum Zeitpunkt der Geburt scheint die positive Korrelierung beider Hormone nicht zu bestehen: der Progesteronspiegel ist niedriger, der 5α-DHP-Spiegel höher als die entsprechenden Werte des Normalkollektivs.

5. Die untersuchten Fälle von Rh-Inkompatibilität, Diabetes mellitus und Frühgeburtlichkeit lassen keine signifikanten Unterschiede zum Normalkollektiv erkennen.

6. Für das Azidosekollektiv wurden in der Tendenz höhere Progesteronwerte und signifikant höhere 5α-DHP-Werte gemessen ($p < 0{,}05$).

7. Bei Untersuchungen mütterlicher und kindlicher Parameter ließen sich weder für die Parität, noch für das Geschlecht des Kindes ein Einfluß auf die Hormonkonzentration feststellen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

CHESLEY, L.C. and TEPPER, I.H.: Effects of progesterone and estrogen on the sensitive to angiotensin II. J. Clin, Endocr. 27, 576-581 (1967).

EVERETT, R.B., WORLEY, R.J., MAC DONALD, P.C. and GANT, N.F.: Modification of vascular responsiveness to angiotensin II in pregnant women by intravenously infused 5α-dihydroprogesterone. Am.J. Obstet. Gynecol. 131, 352-357 (1978).

GANT, N.F., DALEY, G.L., CHAND, S., WHALLEY, P.J. and MAC DONALD, P.C.: A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. J. Clin. Invest. 52, 2682-2689 (1973).

GIBB, W., LAVOIE, J.C. and ROUX, J.: In vitro conversion of pregnenolone to progesterone by term human fetal membranes. Am. J. Obstet. Gynecol. 136, 631-634 (1980).

GOECKE, C.: Pathogenese und Klinik der Spätgestose (EPH-Gestose). Med. Klin. 65, 1957-1966 (1970).

HARBERT, G.M., MC GAUGHEY, H.S., SCOGGIN, W.A. and THORTON, W.N.: Concentration of progesterone in newborn and maternal circulations at delivery Obstet. Gynecol. 23, 413-426 (1964).

JOHANSSON, E.D.S. and JONASSON, L.E.: Progesterone levels in amniotic fluid and plasma from women. I. Levels during normal pregnancy. Acta Obstet. Gynecol. Scand.50, 339-343 (1971).

JONASSON, L.E. and JOHANSSON, E.D.B.: Progesterone levels in amniotic fluid and plasma from women. II. Levels during pregnancies complicated by Rh-isoimmunisation or hepatosis gravidarum. Acta Obstet. Gynecol.Scand.50, 345-350 (1971).

KAPLAN, N.M. and SILAH, J.G.: The effect of angiotensin on the blood pressure in humans with hypertensiv disease. J. Clin. Invest. 43, 659-669 (1964).

KOREN, Z., SCHULMAN, H., LEV-GUR, M., GATZ, M., THYSEN, and BLOCH, E.: Progesterone levels in amniotic fluid and maternal plasma in prostaglandin $F_{2\alpha}$-induced midtrimester abortion. Obstet. Gynecol. 48, 472-474 (1976).

LAUZON, S. DE, CITTANOVA, N., DEFOSSES, B. and JAYLE, M.F.: in "Radioimmunoassay of steroidhormones", 55-61. Ed.: GUPTY, D., Verlag Chemie, Weinheim (1975).

LURIE, A.O., REID, D.E. and VILLEE, C.A.: The role of the fetus and placenta in maintenance plasma progesterone.
Am. J. Obstet. Gynecol. 96, 670-675 (1966).

MENNUTI, M.T., WU, Ch.H., MELLMAN, W. J. and MIKHAIL, G.: Amniotic fluid testosterone and follicle stimulating hormone levels as indication of fetal sex during mid-pregnancy.
Am. J. Med. Genet. 1, 211-216 (1977).

MILEWICH, L., GOMEZ-SANCHEZ, C., MADDEN, J.D. and MAC DONALD, P.C.: Isolation and characterization of 5α-pregnane-3,20-dione and progesterone in peripheral blood of pregnant women. Measurement throughout pregnancy.
Gynecol. Invest. 6, 291-302 (1975).

MILEWICH, L., GANT, N.F., SCHWARZ, B.E., PROUGH, R.A., CHEN, G.T., ATHNEY, B. and MAC DONALD, P.C.: Initiation of human parturition. VI. Identification and quantitation of progesterone metabolites produced by components of human fetal membranes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 400-411 (1977).

MILEWICH, L., GANT, N.F., SCHWARZ, B.E., CHEN, G.T. and MAC DONALD, P.C.: Initiation of human parturition. VIII. Metabolism of progesterone by fetal membranes of early and late human gestation.
Obstet. Gynecol. 55, 45-48 (1977).

MILEWICH, L., GANT, N.F., SCHWARZ, B.E., CHEN, G.T. and MAC DONALD, P.C.: Initiation of human parturition. VII. Partial characterisation of progesterone metabolizing enzymes of human amnion and chorion laeve.
J. Steroid. Biochem. 11, 1577-1582 (1979).

NAGAMANI, M., MC DONOUGH, P.G., ELLEGOOD, J.O. and MANESH, V.B.: Maternal and amniotic fluid steroid throughout human pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. 134, 674-680 (1979).

PULKKINEN, M.O. and ENKOLA, K.: The progesterone gradient of the human fetal membranes.
Int. J. Obstet. Gynecol. 10, 93-94 (1972).

RODECK, C.H., CAMPBELL, S. and BISWAS, S.: Maternal plasma alpha-fetoprotein in normal and complicated pregnancies.
Br. J. Obstet. Gynaecol. 83, 24-32 (1976).

SAMMOUR, C.H., EL-KABARITY, H. and KHALIFA, A.S.: Progesterone therapy in pre-eclamplic toxaemia. Acta Obstet. Gynecl. Scand. 54, 195-2o2 (1975).

SCHINDLER, A.E. and SIITERI, P.K.: Isolation and quantitation of steroids from normal human amniotic fluid.
J. Clin, Endocriol. Metab. 28, 1189-1198 (1968).

SCHINDLER, A.E.: Steroide im Fruchtwasser.
Fortschr. Geburtshilfe Gynaecol. 46, 1-89 (1972)

SCHINDLER, A.E. und Keller, E.: Grundlagen des Steroidstoffwechsels bei Schwangerschaften mit Rh-Inkompatibilität.
Z. Geburtshilfe Perinatol 177, 3o5-314 (1973).

SCHINDLER, A.E., FRIEDRICH, E., BARTH, R., SPARKE, H. and WUCHTER, J.: Steroid profiles in amniotic fluid, cord plasma and newborn urine.
In: SCHOELLER, R. (ED.): Hormonal investigation in pregnancy. Sepe, Paris, 6o3-614 (1974).

SCHINDLER, A.E.: Hormones in human amniotic fluid.
Berlin,Heidelberg New York (1982).

SIPPELL, W.G., MÜLLER-HOLVE, W., DÖRR, H.G., HILLINGMAIER, F. and KNORR, D.: Concentrations of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol and cortisone determined simultaneously in human amniotic fluid throughout gestation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 385-392 (1981).

STOA, K.F. and BESSESEN, A.: Identification and quantitation of 5α-pregnandione in human pregnancy plasma.
J. Steroid. Biochem. 6, 21-25 (1975).

WARNE, G.L., FAIMAN, C., REYES, F.I. and WINTER, J.S.D.: Studies on human sexual developement. V. Concentrations of testosterone, 17-hydroxyprogesterone and progesterone in human amniotic fluid throughout gestation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 934-938 (1977).

WIEST, W.G.: Estimation of progesterone in biological tissues and fluids from pregnant women by double isotope derivate.
Steroids 1o,.279-29o (1967).

WU, C.H. MENNUTI, M.T. and MIKHIL, G.: Free and protein bound steroids in amniotic fluid of mid-pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. 133, 666-762 (1979).

YOUNGLAI, E.V., EFFER, S.B. and PELLETIER, C.: Amniotic fluid progestins and estrogens in relation to length of gestation.
Am. J. Obstet. Gynecol. 111, 833-839 (1971).

ZANDER, J. und VON MÜNSTERMANN, A.M.: Progesteron im menschlichen Blut und Geweben. III. Progesteron in der Plazenta, in der Uterusschleimhaut und im Fruchtwasser.
Klin. Wochenschr. 34, 944-953 (1956).

L E B E N S L A U F

1956	am 17.6. in Siegen/Westfalen geboren als Sohn des Internisten Dr.med. Hans-Wilhelm Reinecke und der Kinderärztin Dr. med. Hildegunde Reinecke, geb. Seeger,
1959	Geburt meines Bruders Stefan.
1961	Geburt meines Bruders Jens.
1963	Einschulung in die Evg. Volksschule an der Arnoldstraße in Mülheim-Ruhr.
1967	Wechsel zum Neusprachlichen Gymnasium Broich in Mülheim-Ruhr.
1975	Allgemeine Hochschulreife am 7.6. an dieser Schule, Immatrikulation im WS 1975/76 an der Universität Tübingen im Studiengang Chemie/Diplom.
1976	Wechsel zum WS 1976/77 an die Medizinische Fakultät der Freien Universität Brüssel.
1978	Quereinstieg in das Medizinstudium an der Ruhr-Universität Bochum zum SS 1978. Seit WS 1978/79 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Tübingen.
1979	Ärztliche Vorprüfung am 2o.3. in Tübingen.
198o	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 2o.3. in Tübingen. Zusätzliche Aufnahme des Studiums der Philosophie und Germanistik im SS 198o in Tübingen.
1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 2o.8. in Tübingen. Zum WS 1982/83 Wechsel an die Medinzinische Fakultät der Universität Göttingen, Absolvierung des Praktischen Jahres am Akademischen Lehrkrankenhaus, Zentralkrankenhaus St.Jürgenstraße in Bremen.
1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 17.1o. in Göttingen.

In gleichzeitig durchgeführten Untersuchungen wurden die Östriol-, HPL- und 5α-Pregandion-Werte eines Normalkollektivs, dreier pathologischer Kollektive, sowie die Progesteron und 5α-DHP-Werte im arteriellen und venösen Nabelschnurblut bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Doktorarbeiten von Eva Klemm-Wolfgramm, Florian Bopp und Egbert Tannich im Jahre 1983 veröffentlicht.